

固相萃取技术在天然药物化学成分分析中的应用

封淑华¹, 李力更² (1. 河北省药检所, 河北 石家庄市 050011; 2. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄市 050017)

摘要:目的 从天然产物中分离化学成分或去除杂质, 从而更好地确定其结构、更准确地分析有效成分的含量等。方法 固相萃取(SPE)技术。结果 应用SPE技术可快速有效地分离天然产物中的化学成分或去除杂质的干扰。结论 SPE对天然产物的分析有重要的意义。

关键词:固相萃取(SPE); 分离; 天然产物

Solid Phase Extraction applies to study on chemical components in natural products

FENG Shu-hua¹, LI Li-geng² (1. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Isolate active substances from natural medicinal products. **METHOD** Solid Phase Extraction (SPE). **RESULTS** SPE could apply to isolation of compounds from natural medicinal products quickly and efficiently. **CONCLUSION** SPE is great important to analysis of active components from natural medicinal products.

KEY WORDS: Solid Phase Extraction (SPE), isolation, natural products

在对微量样品的分析(主要指样品的分离或纯化、浓缩)方面,传统的液-液萃取(Liquid-Liquid Extraction, 缩写:LLE)等分析技术有较多的缺陷,例如需要大量溶剂;处理过程中乳化现象的产生;样品处理步骤麻烦复杂;样品的损失等等。固相萃取(Solid Phase Extraction, 缩写:SPE)是近年来发展的用于微量样品的分离和浓缩的技术,它比传统的LLE有更大的优点。SPE采用高效、高选择性的固定相,能显著减少溶剂用量,简化样品预处理过程等等优点。SPE可应用于气相色谱(GC)、液相色谱(HPLC)、红外光谱(IR)、质谱(MS)、核磁(NMR)、紫外-可见光谱(UV/VIS)、原子吸收(AA)等各种分析方法的样品预处理^[1,2]。固相萃取法已经在毒(药)物分析中得到了一些应用^[3]。

1 固相萃取柱的结构

一个固相萃取柱主要由二部分组成:1. 柱管;2. 固定相。如图1。柱管大多由高质聚丙烯制成,外观及形状非常类似注射器。固定相是最重要的部分,有很多种不同类型的固定相,以适应不同的样品,最常见的是以硅胶为基质键合不同官能团的固定相。固定相的选择取决于样品中的待分析物质、样品的溶剂和样品中可能存在的杂质的种类和量。固定相一般为100~1000mg。为保证样品的完全分离或纯化,对于复杂的或高浓度的样品应选择较大量的固定相。

2 固定相的类型

SPE固定相主要有以下三种类型:1. 正相固定相,如硅胶及键合DIOL、CN、NH₂等极性官能团的硅胶。用来保留

(萃取)极性物质。2. 反相固定相,如C₁₈(ODS)、C₈(辛烷基)、C₂(乙基)、CH(环己基)、PH(苯基)固定相。用来保留(萃取)非极性物质。3. 离子交换固定相,如PSA(胺基)、SCX(苯丙磺酸)、PRS(丙磺酸)等。用来保留(萃取)带电荷的物质。

3 选择固定相

选择固相萃取用最佳固定相主要依据两个因素:需要提取的溶质和溶解样品的溶剂。分析物的极性与固定相极性非常相似时可得到分析物的最佳保留。两者极性越相似保留越好,所以要尽量选择极性相似的同定相。例如萃取碳氢化合物(非极性)时要采用反相柱(非极性)。当分析物极性适中时,正反相固定相都可使用。固定相选择还受样品溶剂极性强度的制约。样品溶剂极性强度对于该固定相极性应该相差较大,这样会增强分析物在固定相上的保留,否则将得不到保留或保留很弱。举例来说,样品溶剂为石油醚时,用反相柱就不合适,分析物不会有保留。如果样品溶剂是水或甲醇时就可以用反相柱,不会影响分析物的保留。

4 具体操作步骤

SPE一般有四个基本步骤:1. 固定相活化;2. 样品上柱;3. 洗脱去杂质;4. 洗脱并收集分析物。

活化的目的是预先除去柱内所有杂质并创造一个与样品溶剂相容的环境。一般用两种溶剂来完成,第一个溶剂(初溶剂)用于净化固定相,除去柱中可能原来存在的杂质;另一个溶剂(终溶剂)用于建立一个合适的固定相环境使样

作者简介:封淑华,女,37岁,副主任药师,河北省药检所, E-Mail: liligeng2000@263.net, 电话:0311-6046476

品中待分析物得到适当的保留。初溶剂与终溶剂极性应该相差越大越好。每一活化溶剂用约 1~2mL/100mg 固定相。终溶剂最好与样品溶剂相同。例如,在分析甲醇溶剂中的非极性样品,用 C₁₈(ODS)反相柱时,最好用苯或石油醚为初溶剂,用甲醇为终溶剂。

上样指的是样品加入到 SPE 柱上并使样品溶剂通过固定相的过程,这时分析物和一些样品中的杂质保留在固定相上。

分析物得到保留后,通常需要淋洗固定相去除不需要的样品组分或杂质,此时淋洗溶剂的洗脱强度应略强或等于上样溶剂,尽可能地洗掉更多的干扰组分,但洗脱强度不能强到可以洗脱任何一个分析物的程度。淋洗溶剂体积可为 0.5~1mL/100mg 固定相。

接下来的工作就是选择合适的洗脱剂将分析物从固定相上洗脱下来并收集。必须认真选择洗脱剂,如果洗脱能力太强,则会有更强保留的组分或杂质被洗脱下来;洗脱能力太弱,则可能洗脱不下来所期望的分析物或需要更多的洗脱剂。可以采用梯度洗脱,也可以使用混合溶剂来调节洗脱剂极性强度。洗脱溶剂一般用量为 0.5~1mL/100mg 固定相。收集起来的洗脱液可以浓缩结晶或直接进行其他方面的分析。具体工作时应参考有关文献及技术手册来选择更加适合的固相萃取柱及溶剂。

5 在天然药物有效化学成分分析中应用

SPE 不仅加快了样品处理的速度,而且大大简化了步骤。SPE 已在较复杂的有机化合物分析方面例如体内药物分析、环境监测等方面开始了越来越广泛的应用。SPE 在天然产物的应用研究还刚刚开始,国内在此方面的报告很少。我国的天然药用产物众多,以天然活性药物为模板开发新药,加强对中草药的现代化研究,是我国走向国际市场的重要基础。由于天然产物中的化学成分类型很多,结构复杂等等, SPE 技术在天然产物有效化学成分分析中如结构鉴定、含量测定等方面应用应该更加引起重视。目前已有各种类型的及规格的商品 SPE 柱的商品及配套产品已成为商品并且可以直接购买使用。本人在使用 SPE 技术应用于天然药物中有效化学成分研究时总结的一般经验是:1. 将样品用溶剂如乙醇粗提后减压浓缩;2. 硅胶吸附烘干;3. 进行索氏提取,提取溶剂由石油醚开始逐渐增加极性,这样可将不同极性的化学成分分别控制在不同的提取溶剂中;4. 各提取溶剂再分别进行适当的柱色谱分离;5. 柱色谱接收液再进行 SPE;6. 波谱或光谱分析;7. 结构解析。

SPE-HPLC 联用法还可以应用于许多中草药及中药制剂的分析工作,以下为几例应用此技术对中药有效成分进行分析测定的研究内容。

1. SPE-HPLC 联用:朱炳辉^[4]、李瑾翡^[5]、陈勇^[6]等分别用此法测定了中药海马巴戟丸中淫羊藿苷含量、阳光胶囊中淫羊藿苷含量、双黄连口服液连翘苷的含量。通过在测试前用 SPE 柱预处理待测样品,从而去除了一些干扰杂质,同

时避免样品中其它复杂成分对色谱柱的损伤。

2. SPE-UV 联用:李力更^[7]用 SPE-UV 联用法测定中药槐米中芦丁含量。中药槐米中主要含丰富的有效成分芦丁,其水解后苷元为槲皮素,由于二者的 UV 吸收光谱非常相近,对它们的定量分析一般均需分离后进行,但二者的极性有较大的差异,针对待测成分难吸附(极性较大的苷)、干扰杂质(极性较小的苷元和其他杂质)易吸附而采用 C₁₈-SPE 柱进行测试前预处理,达到去除干扰的目的。如果对于待测成分极性较小,也可用 SPE-C₁₈柱预处理,但此情况是将极性杂质先洗脱掉,再用适当溶剂将待测成分洗脱并接收,达到去除干扰的目的。

3. SPE-TLC 联用:李力更^[8]等用 SPE-TLC 联用法测定中药丹参中有效成分丹参酮 II A 的含量。主要目的也是去除杂质的干扰,使定量分析更准确。

4. 其他:经典的分离中草药苦参中有效成分苦参碱和氧化苦参碱是利用二者的碱性强弱的差异采用 CCD 法分离,此法烦琐并需要使用大量的有机溶剂。李力更^[9]在分离中草药苦参中有效成分苦参碱和氧化苦参碱研究中,先用 C₁₈ SPE 小柱处理样品提取液,使其吸附到小柱上,去除掉一些干扰杂质,然后利用二者的不同的碱性强弱差异,再分别用不同 pH 值的缓冲液洗脱并接收,从而达到了二者的分离的目的。此法简便、快速,并节省了大量的有机溶剂,接近绿色化学的要求。

总之,固相萃取法技术可以应用于许多中草药及中药制剂的研究分析工作,有待我们科技工作者进行更多的研究开发工作。

参考文献

- [1] Thurman EM, Mills MS. Solid-Phase Extraction Principles and Practice. New York, 1997.
- [2] Shackleton CHL, Joanne OW. Use of Sep-Pak cartridges for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis [J]. Clinica Chimica Acta. 1980, (107):231.
- [3] 朱霁红,等. 固相萃取法在毒(药)物分析中的应用[J]. 中国药物依赖性杂志, 2000, 9(4):60.
- [4] 朱炳辉,等. Spe-Park C₁₈固相萃取-高效液相色谱法测定海马巴戟丸中淫羊藿苷含量[J]. 中成药, 1999, 21(10):500.
- [5] 李瑾翡,等. SPE-高效液相色谱法测定阳光胶囊中淫羊藿苷含量[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(4):287.
- [6] 陈勇,等. RP-HPLC 测定双黄连口服液连翘苷的含量[J]. 中成药, 2002, 24(10):761.
- [7] 李力更,等. 固相萃取-分光光度法联用测定中药槐米中芦丁含量的研究[J]. 中成药, 2003, (8):673.
- [8] 李力更,等. SPE-TLC 联用测定中药丹参中有效成分丹参酮 II A 的含量[J]. 中国药科大学学报 2002, 33(特):276.
- [9] 李力更,等. 固相萃取法分离苦参碱和氧化苦参碱.(待发表)

收稿日期:2002-12-25